

ВРЕМЯ- И ДОЗОЗАВИСИМЫЙ КИЛЛИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫМ СРЕДСТВОМ «ФИТОМП»

ФРОЛОВА А.В., ОКУЛИЧ В.К., БУЛАВКИН В.П.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. Изучена антимикробная и антимикотическая активность лекарственного средства растительного происхождения «ФитоМП» в отношении возбудителей хирургической инфекции. С этой целью использован разработанный метод количественного определения время- и дозозависимого киллинга микроорганизмов. Показано, что наиболее выраженной антимикробной активностью лекарственное средство «ФитоМП» обладает в отношении *S. aureus*, а против *C. albicans* проявляет стойкий антимикотический эффект. При этом установлены минимальные ингибирующие концентрации средства и эффективное время его использования при местном лечении гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений. Лабораторные и клинические исследования подтвердили, что использованный метод позволяет в короткие сроки не только определить степень чувствительности изолированного штамма к средству, но и достаточно точно спрогнозировать частоту перевязок с ним для конкретно взятого больного.

Ключевые слова: «ФитоМП», раневая инфекция, чувствительность, антимикробный эффект, антимикотическая активность.

Abstract. Antimicrobial and antimycotic activity of the remedy «PhytoMP» against causative agents of surgical infection was studied. For this purpose the developed method of quantitative determination of time- and dose-dependent killing of microorganisms was used. It has been shown, that the remedy «PhytoMP» possesses the marked antimicrobial / antimycotic activity with regard to causative agents of surgical infection, *S. aureus*, *C. albicans* in particular. Thus minimal inhibiting concentrations of the remedy and the effective time of its use at local treatment of pyo-inflammatory diseases and complications were determined. Laboratory examinations and clinical studies confirmed, that the used method allows not only to determine in short terms the degree of sensitivity of the isolated strain to the remedy, but also to predict precisely enough the frequency of bandaging with it for every concrete patient.

Современная хирургическая инфекция, приобретая ряд существенных особенностей, стала не только клинической, но и общебиологической проблемой. Ежегодно отмечается интенсивное формирование резистентности к антимикробным препаратам у основных возбудителей внутрибольничных инфекций, увеличивается число тяжело протекающих и не поддающихся традиционному лечению осложненных форм гнойных заболеваний. Нерациональное назначение антибактериальных препаратов без достаточного контроля за видовым составом возбудителей и их

чувствительностью к ним способствует развитию селекции полирезистентных микроорганизмов [1-6]. В комплексном ведении пациентов с гнойными ранами значительная роль отводится местному применению антисептических средств. Поэтому большое значение имеют контроль за эффективностью и рациональностью их применения, а также разработка и унификация методов выявления антисептикоустойчивости [7-9].

С целью оптимизации рационального назначения антисептиков, в том числе и растительного происхождения, при местном лечении гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений в хирургии нами предложен метод количественного определения время-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет. – Фролова А.В.

и дозозависимого киллинга (антимикробной активности средства) [рационализаторские предложения А.В. Фроловой, В.К. Окулича, В.П. Булавкина № 9 от 11.01.10 г. и № 33 от 19.03.10 г.]. Целесообразность применения данного метода на этапе выбора эффективного антисептика обусловлена возможностью определения чувствительности / устойчивости возбудителей к средству, времени его действия в ране, а, следовательно, и прогнозирования частоты перевязок.

Целью данной работы явилось изучение с помощью разработанного метода эффективности лекарственного средства растительного происхождения «ФитоМП» из маклей мелкоплодной (*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde), сем. Маковых (*Papaveraceae*) и подорожника большого (*Plantago major* L.), сем. Подорожниковых (*Plantaginaceae*) [10-11] в отношении возбудителей хирургической инфекции.

Методы

Лабораторная и клиническая апробация метода количественного определения время- и дозозависимого киллинга микроорганизмов проведены на штаммах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Candida albicans*, изолированных из раневого содержимого пациентов РНПЦ «Инфекция в хирургии» и УЗ «2-я Витебская областная клиническая больница», находившихся на лечении по поводу абсцессов, флегмон, абсцесса брюшной полости и таза, фурункулов и распространенного фурункулеза, трофических язв, сахарного диабета с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей, бурсита, гнойных ран травматического характера, хронического остеомиелита, послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений.

Лекарственное средство «ФитоМП» при апробации метода использовано в виде 3% настоя при соотношении компонентов «маклей мелкоплодная / подорожник большой» 2:1. Упакованные образцы присыпки «ФитоМП» подвергали радиационному воздействию на г-установке УГУ-400 ГНУ «ОИЭ и ЯИ-Сосны» НАН Беларуси. В асептических условиях в соответствии с требованиями ГФ

СССР XI изд. настой готовили из 300 мг стерильной растительной присыпки, которую помещали в плоскодонную колбу, заливали 10 мл стерильного физиологического раствора натрия хлорида, закрывали пробкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Затем охлаждали в течение 45 мин., процеживали и оставшуюся массу отжимали. Полученный настой доводили стерильным физиологическим раствором до первоначального объема.

Суточные культуры исследуемых штаммов возбудителей хирургической инфекции (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Candida albicans*) готовили на стерильном физиологическом растворе, доводя их концентрации до 0,5 ЕД по *Mc Farland*. Во все лунки плоскодонной полистероловой планшеты вносили бульон *Mueller-Hinton*, затем в опытные – настой, а в 12-ю контрольную – стерильный физиологический раствор. В последнюю очередь во все лунки раскапывали бульон *Mueller-Hinton*, содержащий взвесь из суточной культуры исследуемого микроорганизма. Заполненные планшеты помещали в термостат для инкубирования при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение суток (для бактерий) и при $t = 28^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов (для грибов).

Оценку выраженности антимикробной / антимикотической активности проводили визуальным и инструментальным методами через 24 часа для бактерий и через 48 часов – для грибов. Концентрацию антисептика в лунках, в которых среда оставалась прозрачной, считали эффективной или достаточной для подавления роста микроорганизма. При этом за минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали концентрацию настоя в последней лунке, в которой отсутствовал рост микроорганизма. МИК средства рассчитывали в мг/мл в пересчете на действующее вещество.

Для оценки продолжительности антимикробного действия исследуемого средства визуальный и инструментальный контроли проводили до инкубирования в термостате, а затем через 6 часов и в последующем, по возможности, через каждый час инкубации на протяжении суток и более для бактерий, на протяжении 48 часов и более – для грибов.

При визуальном контроле рост возбудителя идентифицировали по помутнению среды. Время, на протяжении которого среда в лунках оставалась прозрачной, считали допустимым для использования антисептика с целью ингибирования роста микроорганизма.

При инструментальном учете, проводимом с помощью иммуноферментного анализатора АИФ-М/340 или фотометра универсального Ф/300 со светофильтром с $\lambda = 540-550$ нм, результат считали положительным, если оптическая плотность ($E_{оп}$) $> 0,4$ OD, отрицательным – $< 0,23$ OD, т.е. чем больше оптическая плотность, тем более интенсивный рост наблюдается в лунке. Результат, полученный в интервале от $< 0,4$ до $> 0,23$, требовал дополнительного визуального учета и подтверждения. За эффективное принимали последнее временное наблюдение, при котором отсутствовал рост микроорганизма.

Получив результаты за 24 часа и более, строили 2 графика: зависимости оптической плотности содержимого лунок ($E_{оп}$) от времени инкубации и от концентрации исследуемого средства, что соответственно означало максимальное время сохранения антимикробного действия средства и минимальную ингибирующую концентрацию в отношении конкретного исследуемого штамма микроорганизма.

Данный способ позволяет, при использовании одного 96-луночного планшета, проводить одновременное изучение антимикробной / антимикотической активности 8 антисептиков в разведениях от 1:3 до 1:3072.

Результаты и их обсуждение

Предварительно проведенный сравнительный анализ клинико-микробиологических исследований раневого содержимого позволил установить, что микрофлора ран имеет специфику и определяет характер и течение гнойно-воспалительного процесса. При всем многообразии видового состава раневой инфекции доминирующую роль в ее возникновении и развитии играет грамположительная микрофлора, представленная в основном стафилококками. Так, из 1335 штаммов, изолированных из раневого содержимого пациентов

с гнойно-воспалительными заболеваниями и осложнениями, 829 (62,10%) изолятов представлены *S. aureus*, в то время как *E. coli* встречается в 102 случаях (7,64%), *P. aeruginosa* – в 198 (14,83%), *P. spp.* – в 107 (8,02%) наблюдений. Поэтому поиск лекарственных средств, эффективных в отношении полирезистентных *S. aureus*, продолжает оставаться наиболее актуальной задачей на сегодняшний день.

Разработанный в 70-е годы XX века сотрудниками ВИЛАР антимикробный препарат «Сангвиритрин», представляющий собой сумму бисульфатов бензо[с]фенантридиновых алкалоидов сангвинарина ($C_{20}H_{14}O_4N^+ \cdot SO_4H$) и хелеритрина ($C_{21}H_{18}O_4N^+ \cdot SO_4H$), на протяжении десятилетий подтверждал свою высокую эффективность в хирургической практике, и в настоящее время широко применяется в Российской Федерации для лечения заболеваний бактериального и грибкового генеза [12]. Сырьем для его промышленного получения служит трава культивируемых в южных регионах России восточно-азиатских видов сем. *Papaveraceae* Juss. – маклейи сердцевидной (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) и маклейи мелкоплодной (*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde) (ФС-42-2666-89 РФ). «Сангвиритрин» использован в данном исследовании в качестве препарата сравнения.

Ранее проведенные микробиологические исследования показали, что с целью достижения выраженной антимикробной активности лекарственного средства «ФитоМП» необходимо использовать соотношение его компонентов «маклейи мелкоплодная / подорожник большой» 2:1.

Для оценки действия антисептических средств и признака чувствительности / устойчивости микроорганизмов к ним предложен комплекс показателей, согласно которому принято положение, что лечебный или профилактический эффект можно ожидать, если минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антисептика меньше его рабочей концентрации в 2-4 раза [13-14]. Поскольку антимикробный эффект «ФитоМП» обусловлен алкалоидами его компонента – маклейи мелкоплодной, то МИК для средства определяли в пересчете на действующее вещество.

Лабораторная апробация разработанного метода количественного определения время- и дозозависимого киллинга продемонстрировала, что в отношении изолированных штаммов *S. aureus* минимальная ингибирующая концентрация «ФитоМПа» составляет 0,002 мг/мл. Проведенные визуальный контроль и инструментальный учет показали, что питательная среда в лунке с внесенным растительным антисептиком в разведении 1:24 сохраняет прозрачность, а оптическая плотность содержимого лунки практически не изменяется на протяжении 24 часов.

Согласно положению Красильникова А.П. (1995), полученные данные позволяли предположить, что при использовании *in vivo* «ФитоМП» будет эффективен в отношении исследуемого штамма в течение суток, поскольку содержание действующего вещества (алкалоидов маклейи) в рабочей концентрации растительного средства более чем в 2-4 раза превышает их количество в МИК.

На рисунках 1 и 2 отражены результаты лабораторной апробации метода при исследовании антимикробной активности «ФитоМПа» в отношении полирезистентного к антибиотикам штамма *S. aureus*, изолированного из гнойной раны травматического характера.

Результаты клинических исследований полностью коррелировали с лабораторными данными и демонстрировали эффективность средства в отношении изолированных штам-

мов *S. aureus* в течение суток, что позволяло проводить одноразовые перевязки.

Оценивая бактерицидную активность «ФитоМПа» в отношении *E. coli*, следует отметить, что настой сохранял антимикробный эффект на протяжении 18 часов, при этом МИК средства составила 0,008 мг/мл.

В отношении *P. aeruginosa* «ФитоМП» оставался эффективным в течение 14 часов, минимальная ингибирующая концентрация средства равнялась 0,016 мг/мл.

Достоверно наименьшей эффективностью средства оказалась в отношении *P. spp.* и прослеживалась лишь на протяжении 7 часов, при этом МИК средства составила 0,032 мг/мл.

«ФитоМП» проявил стойкий антимикотический эффект в отношении *C. albicans*, который характеризовался продолжительностью в течение суток и минимальной ингибирующей концентрацией 0,001 мг/мл.

Заключение

1. Разработанный нами метод количественного определения время- и дозозависимого киллинга (антимикробной активности растительного антисептика) с возможностью проведения визуального и инструментального учета отличается от классических методов и позволяет достаточно точно оценивать антимикробный / антимикотический эффект средства в отношении возбудителя хирургической инфекции, изолированного от конк-

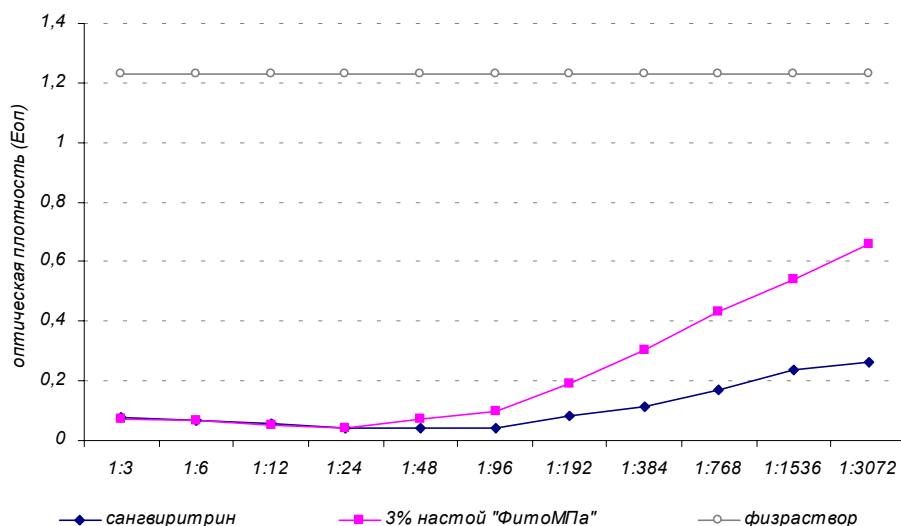


Рис.1. Дозозависимый киллинг конкретного исследуемого штамма *S. aureus* «ФитоМПом».

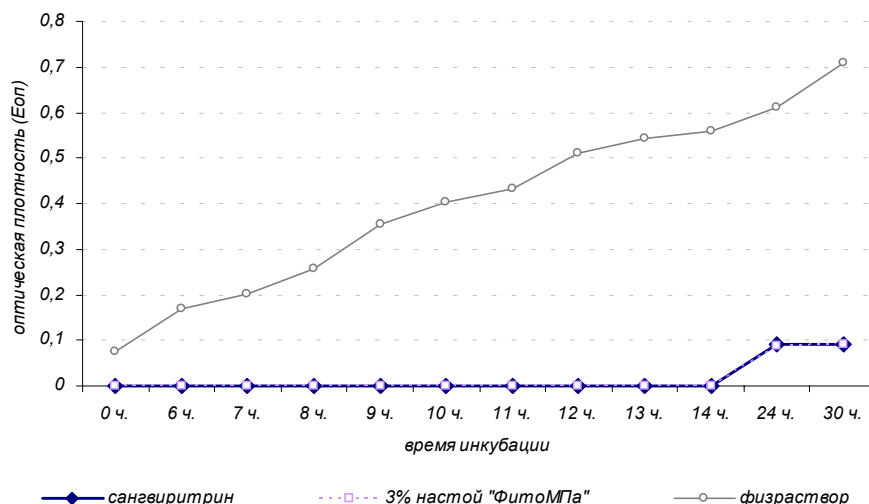


Рис. 2. Времязависимый киллинг конкретного исследуемого штамма *S. aureus* «ФитоМПом».

ретного пациента, для прогнозирования успеха лечения.

2. Лабораторная и клиническая апробация разработанного метода показала, что «ФитоМП» можно рекомендовать для местного лечения раневой инфекции, вызванной полирезистентными к антибиотикам штаммами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. spp.*

3. В отношении *S. aureus* и *C. albicans* «ФитоМП» проявил наиболее высокую эффективность, характеризующуюся длительностью антимикробного и антимикотического действия в течение суток при МИК, равных 0,002 мг/мл и 0,001 мг/мл соответственно, что позволило проводить одноразовые перевязки пациентам с раневой инфекцией, вызванной данными возбудителями.

Литература

- Абаев, Ю.К. Современные особенности хирургической инфекции / Ю.К. Абаев // Вестн. хирургии. — 2005. — Т. 164, № 3. — С. 107-111.
- Косинец, А.Н. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / А.Н. Косинец, Ю.В. Стручков; под ред. А.Н. Косинца. — Витебск: ВГМУ, 2002. — 600 с.
- Ерехин, И.А. Хирургические инфекции: новый уровень познания и новые проблемы / И.А. Ерехин // Инфекц. в хирургии. — 2007. — № 1. — С. 2-7.
- Русаков, В.И. Некоторые общие проблемы хирургии / В.И. Русаков // Вестн. хир. им. И.И. Грекова. — 2000. — Т. 159, № 4. — С. 99-101.
- Сидоренко, С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов / С.В. Сидоренко // Клини. фармакол. и тер. — 2004. — Т. 13, №2. — С. 16-26.
- Nichols, R.L. Surgical infections: prevention and treatment (1965-1995) / R.L. Nichols // Am. J. Surg. — 1996. — Vol. 172, № 1. — P. 68-74.
- Мониторинг антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов-возбудителей нозокомиальных инфекций в Республике Беларусь / Л.П. Титов [и др.] // Резист. микроорг. к антимикр. препар.: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 2003. — 26-27 мая 2003 г. — НИИ микробиологии и иммунологии; редкол.: Л.П. Титов. — Минск, 2003. — С. 57-58.
- Даценко, Б.М. Теория и тактика местного лечения гнойных ран / Б.М. Даценко. — Киев: Здоров'я, 1995. — 380 с.
- Блатун, Л.А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения / Л.А. Блатун // Инфекц. и антимикроб. терап. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 25-29.
- Состав лекарственного препарата: пат 7728 Респ. Беларусь, А 61К 35/78 / А.Н. Косинец, А.В. Фролова, Г.Н. Бузук; заявитель УО «Витебский государственный медицинский университет». — № а 20020872; заявлен. 21.11.2002; опубл. 13.10.05 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. — 2005. — № 1. — С. 155.
- Фролова, А.В. Сравнительный анализ антимикробной активности лекарственных растений / А.В. Фролова, А.Н. Косинец, Г.Н. Бузук // Вестн. фармации. — 2006. — № 4. — С. 54-61.
- Абизов, Е.А. Сангвиритрин / Е.А. Абизов и [и др.] // Мед. помощь. — 2003. — № 4. — С. 41-46.
- Скала, Л.З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л.З. Скала. — Москва: Медицина, 1997. — 184 с.
- Красильников, А.П. Справочник по антисептике / А.П. Красильников. — Минск: «Вышэйшая школа», 1995. — 366 с.

Поступила 27.10.2010 г.

Принята в печать 06.12.2010 г.